

INFLUENCIA DEL MAGNESIO SOBRE LA CAPTACION MUSCULAR DE GLUCOSA Y SOBRE SU INHIBICION POR FRACCIONES PROTEICAS DE PLASMA

Influence of Magnesium on the muscular uptake of glucose and on its inhibition by plasma protein fractions.

LUIS VARGAS y MARCELO CHARLÍN

Departamento de Fisiopatología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Recibido para su publicación el 18 de Mayo de 1963.

RESUMEN

Se presentan experimentos que muestran que el enriquecimiento en Mg del medio amortiguador de Gey desde 1 mM, concentración de la fórmula original, hasta 5 mM, produjo un aumento de la captación básica de glucosa por el diafragma aislado de rata, y al mismo tiempo un aumento del efecto inhibitorio de la subfracción plasmática globulina-alfa₂. En el caso de la fracción plasmática IV-V-VI de Lever *et al.* que contiene tanto insulina como factor inhibitorio, este enriquecimiento del medio aumentó preferentemente la acción inhibitoria.

INTRODUCCIÓN

En un trabajo anterior (1) se ha demostrado que la globulina-alfa₂ y la fracción afín a los metales de la globulina-beta₁ del componente de la fracción IV-V-VI del plasma humano normal inhiben la captación de glucosa por el diafragma aislado de rata. Al parecer, estas globulinas sólo constituyen transportadores del factor responsable de esta inhibición, el "factor inhibitorio alfa₂-beta₁" (IAB). La inhibición producida por estas fracciones es pequeña: (el valor del Δ fue de $-0,9 \pm 0,28$ mg/g/hora para la globulina-alfa₂ y de $-0,8 \pm 0,25$ mg/g/hora para la globulina-beta₁), lo que representa un inconveniente para un estudio más profundo del problema. Por este motivo hemos bus-

cado la manera de aumentar la captación básica de glucosa por el diafragma aislado, con el objeto de que pueda expresarse mejor el efecto inhibitorio. Bhattacharya (2) ha observado que cuando la solución amortiguadora sacarosa-bicarbonato se enriquece con 1 mmole de Mg por litro, aumentan la captación basal de glucosa y el efecto de la insulina en esta preparación. Esta observación nos ha movido a estudiar si enriqueciendo en Mg el medio amortiguador de Gey, podría obtenerse un aumento semejante de la captación básica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las fracciones plasmáticas. La fracción plasmática IV-V-VI de Lever *et al.* (3) se preparó a partir de plasma humano normal recolectado en la forma antes descrita (1), mediante precipitación con etanol a -5°C . La subfracción globulina-alfa₂ se obtuvo mediante fraccionamiento electroforético de esa fracción. En lugar de la electroforesis en columna de celulosa que se utilizó en los primeros fraccionamientos (1), se empleó electroforesis continua sobre cortina de papel, método que ha demostrado ser igualmente eficaz (4). El líquido así recolectado se sometió a diálisis contra agua destilada a través de membrana de Visking durante 24 horas y enseguida fue liofilizado y conservado a -17°C .

Reconocimiento de las subfracciones. La posición de las fracciones globulina-alfa₂ y globulina-beta₁ se reconoció mediante tinción de

la cortina de papel con azul de bromofenol. La comprobación de esta identificación se obtuvo en primer lugar mediante la curva obtenida en el espectrofotómetro de Beckman en 280 m μ , y fue confirmada posteriormente mediante electroforesis sobre papel, (solución amortiguadora de barbital de pH 8,6; 250 V; 3,0 a 4,5 mA; 16 horas).

Valoración de la actividad inhibitoria. La inhibición de la captación de glucosa se valoró midiendo la diferencia entre la captación (en mg de glucosa por g de diafragma fresco y por hora de incubación) obtenida en presencia de la fracción y en ausencia de ella. Se utilizó la preparación de diafragma aislado según la técnica de Randle (5) o de Jessup (6), incubando $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{8}$ de diafragma en solución amortiguadora de Gey a 37°C durante 90 a 120 minutos. La glucosa se dosificó según el método de Somogyi y Nelson (7), haciendo la lectura colorimétrica en el espectrofotómetro de Beckman. En los testigos se hizo la dosificación en triplicado y en los preparados con agregado de fracciones plasmáticas, generalmente en duplicado.

Enriquecimiento del medio en Mg. La solución amortiguadora de Gey tiene una concentración de 1,0 mmole de Mg por litro. En los diversos experimentos esta concentración

se modificó agregando MgCl₂ para obtener concentraciones hasta 30 mM.

Agregación de las fracciones proteicas. En los experimentos se ensayaron la fracción proteica IV-V-VI y su subfracción globulina-alfa₂. Los respectivos preparados liofilizados se disolvieron en la solución amortiguadora de Gey en la cual se incubaba el diafragma. Las cantidades agregadas equivalían a las que se encuentran en el plasma, es decir, 44 mg/ml de la fracción IV-V-VI y 1 mg/ml de la subfracción globulina-alfa₂.

RESULTADOS

Influencia de la concentración de Mg sobre la captación básica de glucosa. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos en los experimentos destinados a estudiar la influencia de la concentración de Mg sobre la captación básica de glucosa. En ella puede apreciarse que el valor máximo se obtiene con una concentración de Mg 5 mM. La diferencia entre la captación en medio Mg 5 mM y 1 mM fue altamente significativa ($P < 0,001$). Por este motivo se utilizó esta concentración

TABLA I

Influencia del Contenido de Magnesio en el Medio sobre la captación de glucosa por el diafragma aislado de rata

Experimento	Concentración de Magnesio mM	Número de casos N	Captación de glucosa * mg/g/hora	Cálculo Estadístico	
				t	P
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
A	0	4	4,06 \pm 0,34	} 4,27	> 0,001
	1	4	3,88 \pm 0,41		
	5	4	6,06 \pm 0,29		
	10	4	5,92 \pm 0,12		
	15	4	6,16 \pm 0,23		
	20	4	6,29 \pm 0,77		
	30	4	5,84 \pm 0,24		
B	0	6	3,29 \pm 0,38	} 4,37	> 0,001
	5	6	5,90 \pm 0,46		

* media aritmética \pm su error típico.

TABLA II

Influencia del Contenido de Magnesio en el Medio sobre el efecto de las fracciones plasmáticas IV-V-VI y globulina- α_2 sobre la captación de glucosa por el diafragma aislado de rata

Concentración de Magnesio mM	Fracción plasmática	Número de casos N	Captación de glucosa * mg/g/hora	Diferencia	Cálculo Estadístico t	P
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1	0	15	3,06 \pm 0,30	} -0,18	0,43	>0,7
1	IV-V-VI	15	2,88 \pm 0,29			
1	0	15	2,95 \pm 0,22	} -0,59	2,16	< 0,05
1	globulina- α_2	15	2,36 \pm 0,16			
5	0	9	3,39 \pm 0,20	} -0,97	3,34	< 0,001
5	IV-V-VI	9	2,42 \pm 0,21			
5	0	8	6,83 \pm 1,32	} -3,11	2,08	>0,05
5	globulina- α_2	7	3,72 \pm 0,48			

* media aritmética \pm su error típico.

en los experimentos acerca de la acción inhibitoria de las fracciones plasmáticas.

Acción inhibitoria de las fracciones plasmáticas. En la Tabla II aparecen resumidos los resultados que se obtuvieron en los experimentos acerca de la influencia de la concentración de Mg sobre la inhibición de la captación de glucosa por el diafragma ocasionada por la fracción IV-V-VI y por la subfracción globulina- α_2 . En ella puede apreciarse que en el medio con Mg 1 mM la fracción IV-V-VI no produce una inhibición apreciable, mientras que esta llegó a valores de Δ -1,0 mg/g/hora en el medio con Mg 5 mM; en el caso de la subfracción globulina- α_2 la inhibición en el medio con Mg 1 mM fue de Δ -0,59, valor que aumentó a -3,11 mg/g/hora en el medio con Mg 5 mM.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados experimentales son concluyentes en el sentido de que el enriquecimiento en MgCl₂ del medio de Gey

de 1 a 5 mM, produce un aumento tanto de la captación básica de glucosa por el diafragma aislado como de la acción inhibitoria que algunas fracciones plasmáticas ejercen sobre este fenómeno. Estos resultados son concordantes, en cuanto al aumento de la captación básica, con lo observado por Bhattacharya (2) en el medio amortiguador sacarosa - bicarbonato. Llama la atención el hecho de que este enriquecimiento no sólo aumenta la captación básica de glucosa del diafragma, sino que también el efecto de la insulina (2) y del IAB, como se demuestra en este trabajo. Es interesante considerar la situación que se produce con la fracción IV-V-VI, que contiene al mismo tiempo el IAB y la insulina, en sus subfracciones albúmina y globulina- α_1 , y por consiguiente su efecto resulta de la combinación de acciones que inhiben y que estimulan la captación. En las preparaciones IV-V-VI utilizadas en estos experimentos parecen haber estado contrabalanceadas ambas acciones puesto que esta fracción

no produjo en el medio de Gey no enriquecido un cambio significativo en la captación de glucosa, comparada con la básica. Ahora bien, el enriquecimiento del medio en Mg produjo una clara inhibición, lo que hace suponer que el Mg estimuló más la acción del IAB que la de la insulina.

Los resultados obtenidos hacen aconsejable continuar las investigaciones destinadas a aislar el factor inhibitorio utilizando el medio de Gey enriquecido en Mg.

SUMMARY

In a previous paper (1) it was reported that the protein fraction IV-V-VI of Lever *et al.* (3) and more precisely their components α_2 -globulin and β_1 -metal-combining-globulin inhibit the glucose uptake by the isolated rat diaphragm. This inhibition was rather small, which was a great handicap for the isolation of the responsible factor. Since Bhattacharya (2) had observed that the enrichment of the sucrose - bicarbonate buffer with Mg increased both the basal uptake of glucose and the effect of insulin in this preparation, it was pertinent to study whether or not the enrichment of Gey-buffer with Mg could increase the basal uptake to levels allowing a larger inhibition to be revealed. The experimental results showed that the enrichment of the Gey-buffer with Mg increased the basal glucose uptake; the maximal increase being observed with Mg 5 mM (Table I). Testing the inhibitory effect of fraction IV-V-VI and

its subfraction α_2 -globulin in Gey-buffer with Mg 5 mM, clear-cut results were obtained (Table II). The inhibition induced by the α_2 -globulin was significantly increased in the enriched medium reaching to levels never observed before in a non enriched medium. Concerning the fraction IV-V-VI, which contains both insulin and the inhibitor, its effect appears as the result of the combination of these antagonistic actions. The preparations used in these experiments seem to be well balanced, since in the non enriched medium neither inhibition nor stimulation of glucose uptake was observed. In the Mg rich medium a definite inhibition of the glucose uptake was found, showing that Mg ions stimulate the inhibitor factor stronger than insulin.

The results show that the Mg enriched Gey-buffer will be a good tool for further purification of the inhibitory factor.

REFERENCIAS

- 1.—VARGAS, L., TAYLOR, K. W y RANDLE, P. J. *Biochem. J.* **77**:43, 1960.
- 2.—BHATTACHARYA, G. — *Biochem. J.* **79**:369, 1961.
- 3.—LEVER, W. F., GURD, F. R. N., UROMA, E., BROWN, R. K., BARNES, B. A., SCHMID, K. y SCHULTZ, E. L. — *J. Clin. Invest.* **30**:99, 1951.
- 4.—CHARLÍN, M. y VARGAS, L. — *Acta Physiol. Latino-amer.* (En prensa).
- 5.—RANDLE, P. J. — *Brit. Med. J.* **1**:1237, 1954.
- 6.—JESSUP, D. C. y WIBERG, G. S. — *Diabetes* **10**:201, 1961.
- 7.—SOMOGYI, M. — *J. Biol. Chem.* **160**:61, 1945.